棉铃虫转录因子 c-Myc 基因在滞育和非滞育蛹脑中的表达分析及多克隆抗体制备

陈 伟[1,*], 徐卫华[2]

(1. 广东药学院生命科学与生物制药学院, 广东省生物技术候选药物研究重点实验室, 广州 510006;
2. 中山大学生命科学学院, 有害生物控制与资源利用国家重点实验室, 广州 510275)

摘要:【目的】c-Myc 是近年来研究较多的转录因子,也是受 Wnt/β-catenin 信号通路调节的重要靶标。本研究旨在克隆棉铃虫 *Helicoverpa armigera* c-Myc 基因,从核酸水平初步调查 *c-myc* 在滞育和非滞育蛹脑中的表达情况,同时制备其蛋白的多克隆抗体。【方法】通过 RACE 方法克隆棉铃虫 *c-myc* 基因的 cDNA,运用 RT-PCR 方法比较滞育和非滞育蛹脑中 *Har-c-myc* 基因的表达情况。根据获取的序列构建原核表达载体,在大肠杆菌 *Escherichia coli* 中进行表达,纯化后免疫新西兰兔,制备了多克隆抗体。【结果】克隆了棉铃虫 *c-myc* 基因,核酸水平的研究表明滞育蛹脑中 *c-myc* 表达水平明显低于非滞育蛹脑。成功地在大肠杆菌中表达了 c-Myc 部分肽段并通过镍柱纯化获得了较纯的重组蛋白。制备的 c-Myc 抗体效价达到了 1∶125 000。【结论】滞育蛹脑中 *Har-c-myc* 的表达下调。获得了抗棉铃虫 c-Myc 的多克隆抗体。本研究的成果为后续进一步深入研究棉铃虫 Wnt/β-catenin 信号通路在棉铃虫发育中的作用奠定了基础。

关键词: 棉铃虫; 滞育; 转录因子; c-Myc; 多克隆抗体; Wnt/β-catenin 信号通路
中图分类号: Q966 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296(2015)02-0115-07

Gene expression profiling and polyclonal antibody preparation of the transcription factor c-Myc in the brain of diapause and non-diapause pupae of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuiadae)

CHEN Wei[1,*], XU Wei-Hua[2] (1. Guangdong Province Key Laboratory for Biotechnology Drug Candidates, School of Biosciences and Biopharmaceutics, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China; 2. State Key Laboratory of Biocontrol and Institute of Entomology, School of Life Sciences, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract:【Aim】c-Myc is an intensively studied transcription factor and also an important downstream target of Wnt/β-catenin signaling pathway. The objective of this research was to clone the *c-myc* cDNA from *Helicoverpa armigera*, to investigate the expression of *Har-c-myc* in mRNA level, and to prepare polyclonal antibody against Har-c-Myc.【Methods】*Har-c-myc* was cloned by RACE. The mRNA levels of *Har-c-myc* in the brain of non-diapause and diapause pupae were investigated by RT-PCR. Prokaryotic expression vector of *Har-c-myc* was constructed and the recombinant protein was expressed in *Escherichia coli*. The purified recombinant protein was injected into a New Zealand rabbit to generate polyclonal antibody. The antibody titer was determined by ELISA.【Results】*Har-c-myc* cDNA was cloned successfully from *H. armigera*. The mRNA levels of *Har-c-Myc* were significantly lower in the brain of diapause pupae than in the brain of non-diapause pupae. Recombinant Har-c-Myc was successfully expressed in *E. coli* and purified by Ni-NTA agarose column. The titer of the antibody against Har-c-Myc was estimated by ELISA as high as 1∶125 000.【Conclusion】The expression of *Har-c-myc* is down-regulated in the brain of diapause pupae. Antibody against Har-c-Myc was obtained. This study lays a foundation for further investigating the function of Wnt/β-catenin in the diapause of *H. armigera*.

基金项目: 国家自然科学基金项目(31230066); 国家重点基础研究发展计划项目(2012CB114101)
作者简介: 陈伟, 男, 1980 年生, 湖南南县人, 博士, 主要从事昆虫生理生化与分子生物学研究, E-mail: thinker98@163.com
* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: thinker98@163.com
收稿日期 Received: 2014-11-02; 接受日期 Accepted: 2014-12-29

Key words: *Helicoverpa aimigera*; diapause; transcription factor; c-Myc; polyclonal antibody; Wnt/β-catenin signaling pathway

myc 基因是一类较早发现的与肿瘤细胞增殖相关的癌基因,包括 *c-myc*, *n-myc* 和 *l-myc*。其中 *c-myc* 是目前研究最为热门的原癌基因之一。c-Myc 是一个多功能的转录因子,它与其同源的转录因子 Max 形成异源二聚体,与靶标基因启动子上的 E-box 结合,进而调节靶标基因的表达(Benassi *et al*., 2006)。

作为转录因子,c-Myc 自身的表达受多个信号转导通路的调节,如 Wnt/β-catenin, Notch 和 EGF 信号通路等(Ran *et al*., 1986; Logan and Nusse, 2004; Palomero *et al*., 2006)。众所周知,Wnt/β-catenin 是进化上非常保守的、与发育相关的信号通路,它在胚胎发育过程中的细胞命运决定、细胞增殖、细胞极性、组织稳态以及疾病的发生等方面都起着重要的作用(MacDonald *et al*, 2009; Clevers and Nusse, 2012)。在 Wnt/β-catenin 信号通路中,上游因子 Wnt1 配体可以与相应的配体结合,进而促使 β-catenin 在细胞质中累积后进入细胞核并与转录因子 TCF/LEF 结合,最终激活下游靶标基因的转录。c-Myc 便是其中重要的靶标基因之一。

棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 是一种危害严重的农业害虫,每年给全球农业造成巨大的经济损失。外界环境条件的季节性变化往往不利于昆虫的生长发育,而滞育则是棉铃虫应对外界不利环境条件的重要的策略之一。昆虫滞育机制的研究是昆虫学领域热点之一,其研究方向已逐步转向滞育的分子机制研究(Bao and Xu, 2011; Tian and Xu, 2013)。Wnt/β-catenin 信号通路在昆虫的生长发育中起重要的调节作用,是否也参与昆虫的滞育过程? 该问题的解决有利于我们进一步从分子水平阐述滞育的机制,同时可以为 Wnt/β-catenin 信号通路在胚后发育中的作用提供更多的实例和证据(Nakamura *et al*., 2007; Shah *et al*., 2011),具有较大的理论意义和应用价值。

在前期研究中,我们发现在滞育蛹脑中,Wnt/β-catenin 信号通路中的上游分子 Wnt1 和 β-catenin 的表达均受到下调。作为该信号通路的重要靶标基因,*c-myc* 的表达情况如何是我们比较关心的话题。以此为出发点,本研究首次克隆了棉铃虫的 *c-myc* 基因,运用 RT-PCR 方法调查了 *c-myc* 在滞育和非滞育蛹脑中的表达差异,进而制备了抗棉铃虫 c-Myc 的多克隆抗体,并初步调查了 c-Myc 蛋白在滞育和非滞育蛹脑中的表达差异,为深入研究 Wnt/β-catenin 信号通路在棉铃虫滞育中的作用奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 实验昆虫

棉铃虫为本课题组所饲养,原产河南省。1-3 龄幼虫在 25℃ 条件下培养,光照条件设定为 14L∶10D。3 龄末期后,滞育型棉铃虫转移到 20℃ 恒温培养箱,光照条件为 10L∶14D。非滞育型棉铃虫也转移至 20℃ 恒温培养箱,光照条件则设定为 10L∶14D。

1.2 菌株、载体、细胞和试剂

大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5α 及 BL21 (DE3)、原核表达载体 pET32a、美洲棉铃虫 *Helioverpa zea* 的卵巢细胞 HzAm1 均为本实验室保存;RACE 试剂盒购自 Clontech 公司;pMD18-T 载体、Taq DNA 聚合酶、DNA 连接试剂盒及限制性核酸内切酶购自 TaKaRa 公司;质粒 DNA 小量提取试剂盒、DNA 产物纯化试剂盒购自爱思进生物技术有限公司;Trizol 购自 Invitrogen 公司;Ni-NTA 琼脂糖柱填料购自 Qiagen 公司;蛋白 Marker、HRP 偶联的羊抗兔二抗以及 Western blot 所用发光液均购自 Thermo 公司;弗氏佐剂购自 Sigma 公司;引物合成及测序由潍捷基(上海)贸易有限公司完成。其他试剂均为分析纯(A. R.)。

1.3 RACE 克隆序列分析

按照 RACE 试剂盒提供的步骤进行,简述如下:各取 1 μg RNA 作为模板,分别合成 5′-RACE cDNA 库和 3′-RACE cDNA 库。根据克隆到的基因中间片段设计基因特异性引物,用基因特异性引物和试剂盒中的引物进行嵌套 PCR。扩增后的片段与 pMD18-T 载体连接、转化,鉴定正确后测序分析。利用 DNAStar 对测得的序列进行分析、预测 Har-Wnt1 的开放阅读框。

1.4 RT-PCR

按照试剂盒提供的方法,取 20 个蛹脑,加入 1 mL Trizol 进行匀浆,提取总 RNA。定量后,取 1 μg RNA 进行逆转录,合成第一链 cDNA。*myc* 基因 RT-PCR 检测引物序列为 RACE 所用基因特异性引物

myc3F1 和 myc5R1（具体序列见图 1），扩增片段大小为 561 bp。内参 RpL32 引物为 RpL32-F（5′-CCCGTCACATGCTACCCAATGG-3′） 和 RpL32-R（5′-CTCGCTCCACGATGGTCTTGC-3′），扩增片段大小为 146 bp。首先通过预实验确定扩增的最佳循环数，以确保能如实反映基因表达的丰度。最后用 ImageJ 软件对电泳条带进行灰度扫描分析，比上 *RpL32* 的值作为 *c-myc* 的相对表达量。

1.5　原核表达载体 pET32a-*c-myc* 的构建

根据克隆的 *Har-c-myc* 的 cDNA 序列，设计引物，两端分别含有 *Bam*HI 和 *Hind* Ⅲ 酶切位点，扩增一段编码 152 个氨基酸残基的序列。正向引物序列为： 5′-AACGGATCCTGTATGTGGCAGGCTCTTG-3′；反向引物序列为：5′-TTCAAGCTTCGTGATGGCGGTCTCCACAG-3′，其中下划线表示酶切位点。扩增所得的目的片段和 pET32a 载体用 *Bam*HI 和 *Hind* Ⅲ进行双酶切，连接后转化大肠杆菌 DH5α。挑选克隆，经菌落 PCR 鉴定正确后送交测序验证。

1.6　Har-c-Myc 部分肽段的原核表达及纯化

小规模诱导表达：将 pET32a-*c-myc* 转化大肠杆菌 BL21（DE3），挑选单菌落过夜培养后转接至新的 LB 培养液中，37℃ 培养至 OD_{600} 约 0.6 时加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG，25℃ 培养 4 h 后测 OD_{600} 的值，取 160/OD_{600} μL 菌液，离心收集细菌。SDS-PAGE 检测重组蛋白是否表达。

小规模诱导表达成功后，按同样的条件进行大规模诱导，总菌液量为 1 L。离心收集细菌，用结合 Buffer（20 mmol/L Na_3PO_4，500 mmol/L NaCl，pH 7.8）重悬细菌。超声破碎（超声 2 s，停 2 s，总共 45 min），离心后取 10 μL 上清，挑取少许包涵体进行电泳，确定融合蛋白是否可溶表达。重组蛋白镍柱上样后，咪唑浓度梯度洗脱，收集洗脱液，进行 SDS-PAGE 检测。

1.7　多克隆抗体的制备

纯化的重组蛋白免疫新西兰兔，制备多克隆抗体。用 1 mg 纯化蛋白与等体积的弗氏完全佐剂（首次免疫）或弗氏不完全佐剂（加强免疫）混匀，充分乳化后皮下多点注射。4 次免疫后收集血清。

1.8　ELISA 检测抗体效价

在 96 孔板的每孔加入 2 pmol 纯化的蛋白，4℃ 包被过夜。弃去包被液，用 PBST（PBS 中加入0.5% 的 Tween-20）洗板。2% 脱脂奶粉室温封闭 1 h 后依次加入一定比例稀释的一抗和 1∶3 000（v/v）稀释的二抗。PBST 洗板后加入 DAB 显色液，室温避光显色，约 5～10 min 后 H_2SO_4 终止反应。

1.9　Western blot 检测

电泳结束后，将凝胶与 PVDF 膜在转膜 Buffer（25 mmol/L Tris，192 mmol/L 甘氨酸，20% 甲醇）中浸泡 15 min。转膜（100 V，60 min）后用 5% 脱脂奶粉（溶于 PBST 中）室温封闭 1 h。一抗 1∶3 000（v/v）室温孵育 1 h，PBST 洗膜 4 次（每次 5 min）；二抗 1∶3 000（v/v）室温孵育，洗膜后 ECL 淋洗，在暗房显影曝光。

1.10　数据统计

RT-PCR 的结果用 ImageJ 软件进行光密度分析，3 次重复实验的数据用 SPSS 软件，采用独立样本 *T* 检验进行分析比较滞育和非滞育蛹脑中的差异。

2　结果

2.1　棉铃虫 *c-myc* 基因的克隆与氨基酸序列分析

根据近缘物种家蚕 *Bombyx mori* 和帝王蝶 *Danaus plexippus* 的 *c-myc* 基因序列，设计简并引物，获取了棉铃虫 *c-myc* 基因的中间片段，约 500 bp（图 1）。中间片段测序后经 BLAST 比较，发现与家蚕和帝王蝶的 *c-myc* 基因有很高的同源性，因此，我们成功获取了棉铃虫 *c-myc* 的中间片段。

根据中间片段的序列，设计 3′ RACE 基因特异性引物 myc3F1 和 myc3F2 以及 5′ RACE 基因特异性引物 myc5R1 和 myc5R2（图 2）。按照 1.3 节的方法，从棉铃虫脑中克隆到了棉铃虫的 *c-myc* 基因（命名为 *Har-c-myc*，序列已提交 NCBI，GenBank 登录号为 KJ206239）。*Har-c-myc* 全长 2 173 bp，其中开放阅读框长1 104 bp，编码一个367 aa的蛋白质。将

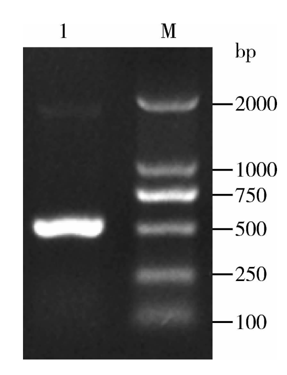


图 1　*Har-c-myc* 基因中间片段电泳

Fig. 1　Analysis of PCR product of *Har-c-myc* amplified with the degenerated primers

1：PCR 产物 PCR product；M：DNA 分子量标准物 DNA marker.

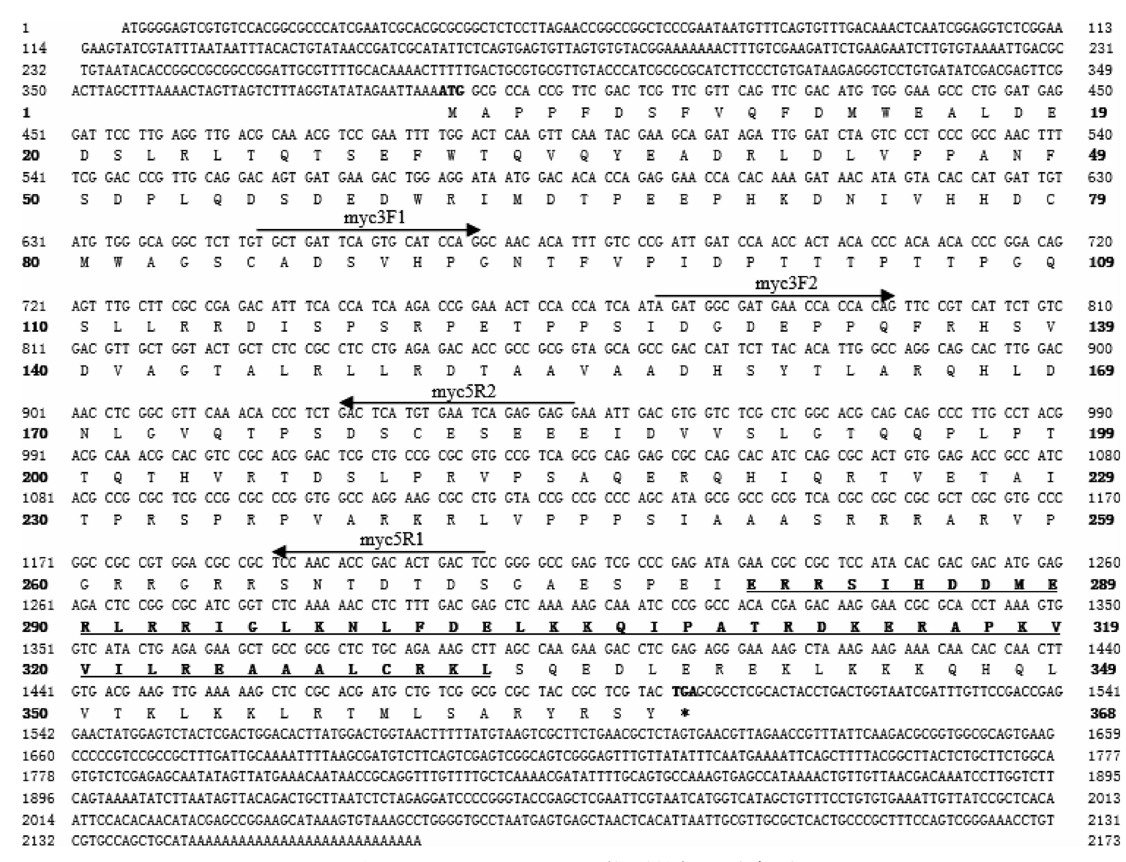


图 2 *Har-c-myc* cDNA 及推测的氨基酸序列

Fig. 2 cDNA sequences and the deduced amino acid sequences of *Har-c-myc*

起始密码子和终止密码子用粗体标示；箭头表示 RACE 所用的基因特异性引物；粗体并用下划线标出的氨基酸序列表示预测的 bHLH 结构域。The translation start and stop codons are indicated in bold, the specific primers for RACE are showed with arrows, and the predicted bHLH (basic helix-loop-helix) domain is in bold and underlined.

Har-c-Myc 蛋白序列提交在线网站 ExPASy (http://prosite.expasy.org/)进行预测，发现在其羧基端含有 1 个 bHLH (碱性螺旋-环-螺旋)结构域(图 2)，这与已报道的其他物种的 c-Myc 蛋白相似。

2.2 滞育和非滞育蛹脑中 *Har-c-myc* 的相对表达量分析

运用 RT-PCR 从核酸水平比较化蛹 10 d 后滞育和非滞育蛹脑中 *Har-c-myc* 的表达水平。结果如图 3 所示，*Har-c-myc* 在滞育和非滞育蛹脑中均有表达，但表达量有较大的差异，滞育蛹脑中 *Har-c-myc* 明显低于非滞育蛹脑，而作为内参对照的 *RpL32* 则基本一致。

2.3 Har-c-myc 部分肽段的原核表达及纯化

Har-c-myc 原核表达载体构建成功后转化大肠杆菌 BL21(DE3)。转化子经 1 mmol/L 的 IPTG 在 20℃诱导 3 h 后，在约 37 kD 处有一条明显的蛋白条带，未加 IPTG 诱导的转化菌则无该条带，而未插入 Wnt1 部分序列的空载体转化菌则在 20 kD 处有一条明显的条带(图 4: A)，因此诱导表达的部分 c-Myc 肽段序列约 17 kD，与理论预测值 16.4 kD 基本符合，这说明构建的原核表达载体表达成功。

重组蛋白主要在上清表达，因此将上清过镍柱进行纯化，先后用 20，50，100，300 和 1 000 mmol/L 浓度的咪唑进行梯度洗脱。电泳结果显示在 300 和 1 000 mmol/L 咪唑洗脱液中重组蛋白蛋白较纯(图 4: B)，综合考虑浓度和纯度因素，选取 300 mmol/L 洗脱液浓缩后进行后续实验。

2.4 Har-Wnt1 多克隆抗体的效价检测

4 次免疫后，ELISA(酶联免疫吸附法)测定抗体的效价。如图 5 所示，2 pmol 的抗原与 1∶125 000 稀释的抗体孵育后呈现出肉眼可见的颜色反应。而 1∶1 000 稀释的免疫前血清及 PBST 对照则无此颜色反应。

2.5 Har-c-Myc 抗体的 Western blot 分析

制备抗体后，我们用 Western blot 的方法检测了棉铃虫蛹脑中的 c-Myc 蛋白表达情况。取化蛹 10 d

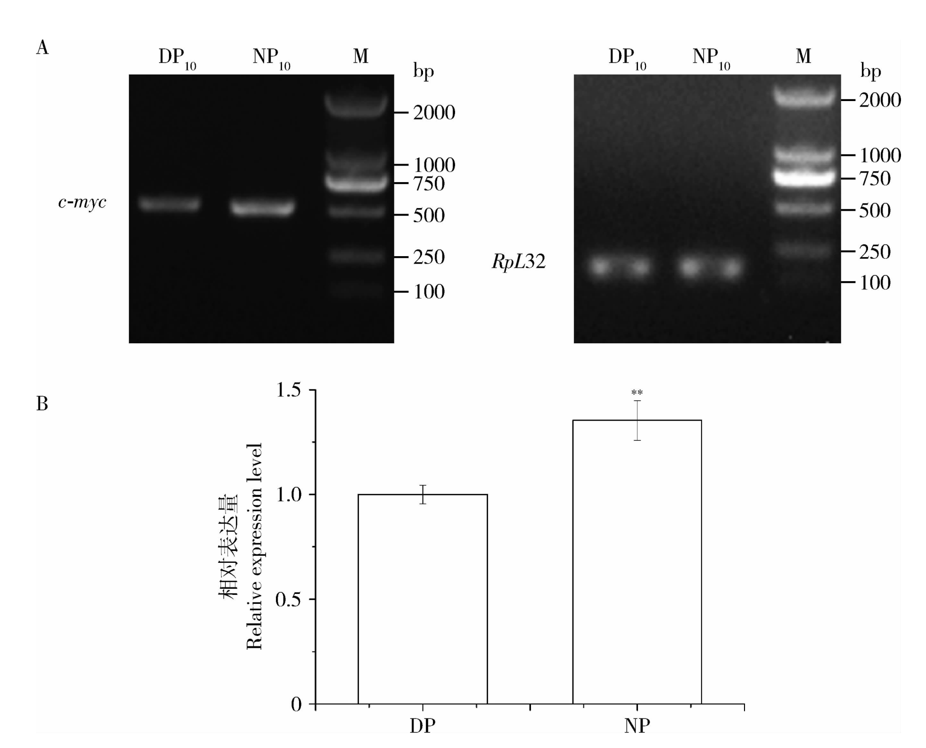


图 3　RT-PCR 检测 *Har-c-myc* 在棉铃虫滞育和非滞育蛹脑中的表达变化

Fig. 3　Expression levels of *Har-c-myc* in the brain of the diapause and non-diapause pupae of *Helicoverpa armigera*

A：RT-PCR 检测滞育和非滞育蛹脑中 *Har-c-myc* 表达量 *Har-c-myc* mRNA levels determined by RT-PCR. DP_{10}：化蛹后 10 d 的滞育蛹脑 Brain of diapause pupae which have pupated for 10 d；NP_{10}：化蛹后 10 d 的非滞育蛹脑 Brain of non-diapause pupae which have pupated for 10 d；M：DNA 分子量标准物 DNA marker. B：A 图 3 次重复实验的灰度扫描分析结果，数据为平均值 ± 标准差。运用独立样本 *T* 检验分别比较 *Har-c-myc* 在不同天数的差异情况，*RpL*32 作为内参对照；双星号表示极显著差异（$P<0.01$）。The *Har-c-myc* bands in figure A (three replicates) were quantified using ImageJ software and normalized to the levels of *Har-RpL*32. Each point represents the mean ± *SD* of three independent replicates. Double asterisks indicate extremely significant difference at the 0.01 level determined by the independent *t*-test.

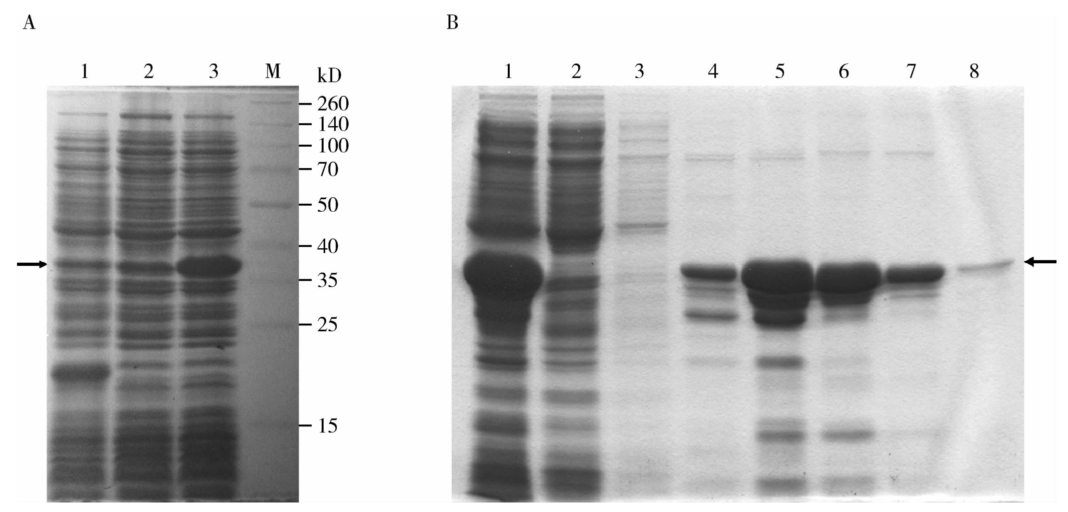


图 4　Har-c-Myc 部分片段的原核表达（A）和纯化（B）

Fig. 4　Prokaryotic expression (A) and purification (B) of partial Har-c-Myc protein

A：*Har-c-myc* 的原核表达，在 20℃诱导，IPTG 终浓度为 1 mmol/L，箭头表示诱导出的重组蛋白 Prokaryotic expression of *Har-c-myc*. *Escherichia coli* BL21 (DE3) cells were induced with IPTG (1 mmol/L) at 20℃. The arrow indicates the induced recombinant protein. 1：空载体 pET32a 转化 BL21 (DE3)，IPTG 诱导 *E. coli* BL21 (DE3) transfected with pET32a and induced with IPTG；2：重组载体转化 BL21(DE3)，未加 IPTG 诱导 *E. coli* BL21 (DE3) cells transfected with recombinant plasmid not induced with IPTG；3：重组载体转化 BL21(DE3)，加 IPTG 诱导 *E. coli* BL21 (DE3) cells transfected with recombinant plasmid induced with IPTG；M：蛋白质分子量标准物 Protein marker. B：Har-c-Myc 重组蛋白的纯化 Purification of the recombinant Har-c-Myc protein. 1：纯化前上清 Supernatant after ultrasonication；2：过柱后流出液 Elute of supernatant after incubation with Ni-NTA agarose column；3 - 8：分别为 20，50，100，150，300 和 1 000 mmol/L 咪唑过柱后的洗脱液 Elutes after column chromatography of 20, 50, 100, 150, 300 and 1 000 mmol/L imidazole, respectively. 箭头表示重组 Har-c-Myc。The arrow indicates the purified recombinant protein.

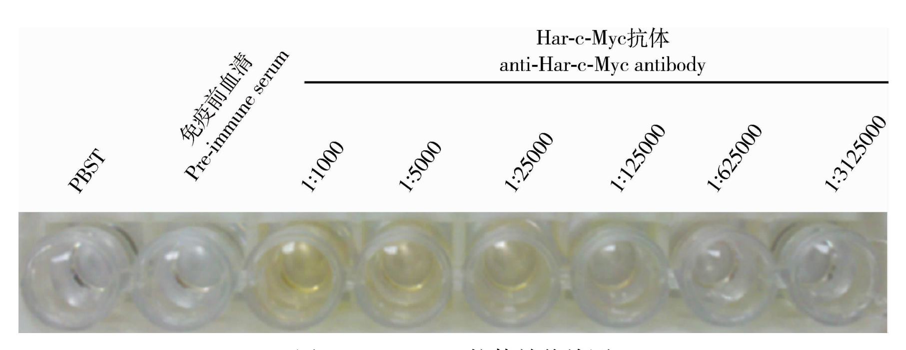


图 5 Har-c-Myc 抗体效价检测

Fig. 5 Titer of anti-Har-c-Myc antibody detected by ELISA

PBST 和免疫前血清为阴性对照,分别用 PBST 和 1∶1 000 稀释的免疫前血清与抗原孵育后显色;1∶1 000 等数字表示 Har-c-Myc 抗血清不同比例稀释后与抗原孵育后显色的结果。Different dilution ratios of anti-Har-c-Myc antibody were incubated with 2 pmol purified recombinant Har-c-Myc protein. PBST and 1∶1 000 diluted pre-immune serum as the control samples.

后的滞育蛹脑,提取蛋白,上样 60 μg 进行检测。结果在约 45 kD 处出现一条明显的条带,其大小与预期基本一致,同时整个背景清晰,基本无杂带。说明我们制备的抗体有较好的特异性(图 6)。

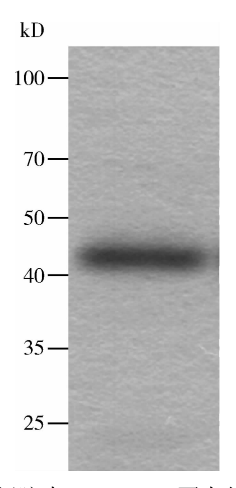


图 6 棉铃虫滞育蛹脑中 Har-c-Myc 蛋白的 Western blot 检测

Fig. 6 Western blotting of Har-c-Myc in the brain of diapause pupae of *Helicoverpa armigera*

上样 60 μg 滞育蛹脑蛋白进行 Western blot 检测,一抗 1∶2 000 (v/v) 稀释,二抗 1∶3 000 (v/v) 稀释。A sample of 60 μg proteins from brains of diapause pupae was separated and detected with Har-c-Myc antibody. The primary antibody and the secondary antibody were diluted to 1∶2 000 and 1∶3 000 (v/v), respectively.

3 讨论

Wnt/β-catenin 通路是一条重要的且与发育相关的信号通路,虽然该通路在滞育中的研究未见系统报道,但有证据表明 Wnt/β-catenin 或许在滞育过程中起到了一定的作用。首先,Wnt/β-catenin 通路中的关键作用分子 GSK-3β 的磷酸化水平在家蚕滞育卵和正常卵中有明显的差异,打破滞育也会导致其发生变化(Lin *et al*., 2009)。其次,Wnt/β-catenin 通路的关键作用因子 β-catenin 可以与转录因子 FOXO 相互作用而增强 FOXO 的转录活性,高的氧化压力能促进它们之间的结合。FOXO 与 TCF/LEF 存在竞争关系,β-catenin 与 FOXO 结合会导致 TCF/LEF 转录活性的降低,因此在高氧压条件下,由于 FOXO 的竞争,Wnt/β-catenin 通路会受到抑制(Essers *et al*., 2005; Almeida *et al*., 2007; Hoogeboom *et al*., 2008)。有趣的是,本实验室调查了棉铃虫中滞育和非滞育蛹脑中的 ROS(活性氧家族)的水平,发现滞育型蛹脑中的 ROS 含量要高于非滞育型蛹脑,且一直维持在较高的水平(鲍斌, 2011)。

鉴于上述原因,我们拟定对棉铃虫蛹脑中 Wnt/β-catenin 通路进行系统的调查。早期的研究发现,Wnt/β-catenin 通路中上游因子 Wnt1 和 β-catenin 在棉铃虫滞育蛹脑中的表达均有所下调。为了进一步确证 Wnt/β-catenin 通路在滞育过程中的调控情况,本研究选定该通路的重要下游靶标 c-Myc 进行调查。首先,我们克隆了 *Har-c-myc* 基因,根据测序结果推测的氨基酸序列具有典型的 c-Myc 蛋白特征:在羧基端含有一个 bHLH (碱性螺旋-环-螺旋)结构域。由于棉铃虫在 20℃ 饲养时,大约化蛹10 d 后进入滞育状态(Xu *et al*., 2012)。因此,我们选定化蛹后 10 d 的滞育和非滞育蛹,运用 RT-PCR 方法从核酸水平对比了这两种发育状态的蛹脑中 *Har-c-myc* 的表达情况。结果与我们的前期工作吻合,*Har-c-myc* 与 *Wnt1* 和 *β-catenin* 的表达趋势一致,均为滞育中下调。据此,我们推测滞育蛹脑中 Wnt/β-catenin 通路受到抑制。当然,这个结论尚需后续的

一系列实验做进一步证实，因为影响 c-Myc 表达的因素较多，影响其在滞育中的表达下调的因素为何？是否与 Wnt1 和 β-catenin 有关？这些我们还不得而知。另外，作为转录因子，Har-c-Myc 通过调节哪些基因的转录进而影响棉铃虫的滞育？这些问题的解决需要我们今后作更进一步的工作。

此外，成功克隆 *Har-c-myc* 基因后，我们构建 *Har-c-myc* 的原核表达载体，在 20℃ 1 mmol/L IPTG 诱导下成功地在大肠杆菌中表达了重组蛋白。经过大规模诱导，重组 Har-c-Myc 主要在上清表达，将上清过镍柱纯化，在 300 mmol/L 咪唑洗脱下获得了较纯的重组蛋白。纯化后免疫新西兰兔，制备了抗 Har-c-Myc 的多克隆抗体，效价高达 1∶125 000。Western blot 结果表明该抗体的特异性较好。

综上所述，本研究通过 RACE 的方法获得了棉铃虫 *c-myc* 基因的 cDNA 序列，从核酸水平同时调查了 *Har-c-myc* 在滞育和非滞育蛹脑的表达情况。同时还构建了其原核表达质粒，进行了原核表达、纯化，并制备了抗体。本研究的结果为进一步深入调查 Wnt/β-catenin 信号通路在棉铃虫滞育过程的作用及其调控奠定了基础。

参考文献（References）

Almeida M, Han L, Martin-Millan M, O'Brien CA, Manolagas SC, 2007. Oxidative stress antagonizes Wnt signaling in osteoblast precursors by diverting β-catenin from T cell factor-to forkhead box O-mediated transcription. *Journal of Biological Chemistry*, 282(37): 27298–27305.

Bao B, 2011. Identification of Important Genes Associated with Pupal Diapause Initiation in the Cotton Bollworm, *Helicoverpa armigera*. PhD Dissertation, Sun Yat-Sen University, Guangzhou. [鲍斌, 2011. 棉铃虫(*Helicoverpa armigera*)蛹滞育进入期重要基因的鉴定与功能研究. 广州：中山大学博士学位论文]

Bao B, Xu WH, 2011. Identification of gene expression changes associated with the initiation of diapause in the brain of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. *BMC Genomics*, 12(1): 224.

Benassi B, Fanciulli M, Fiorentino F, Porrello A, Chiorino G, Loda M, Zupi G, Biroccio A, 2006. c-Myc phosphorylation is required for cellular response to oxidative stress. *Molecular Cell*, 21(4): 509–519.

Clevers H, Nusse R, 2012. Wnt/β-catenin signaling and disease. *Cell*, 149(6): 1192–1205.

Essers MA, de Vries-Smits LM, Barker N, Polderman PE, Burgering BM, Korswagen HC, 2005. Functional interaction between β-catenin and FOXO in oxidative stress signaling. *Science*, 308(5725): 1181–1184.

Hoogeboom D, Essers MA, Polderman PE, Voets E, Smits LM, Boudewijn MT, 2008. Interaction of FOXO with β-catenin inhibits β-catenin/T cell factor activity. *Journal of Biological Chemistry*, 283(14): 9224–9230.

Lin JL, Lin PL, Gu SH, 2009. Phosphorylation of glycogen synthase kinase-3β in relation to diapause processing in the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Insect Physiology*, 55(6): 593–598.

Logan CY, Nusse R, 2004. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 20: 781–810.

MacDonald BT, Tamai K, He X, 2009. Wnt/β-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Developmental Cell*, 17(1): 9–26.

Nakamura T, Mito T, Tanaka Y, Bando T, Ohuchi H, Noji S, 2007. Involvement of canonical Wnt/Wingless signaling in the determination of the positional values within the leg segment of the cricket *Gryllus bimaculatus*. *Development, Growth & Differentiation*, 49(2): 79–88.

Palomero T, Lim WK, Odom DT, Sulis ML, Real PJ, Margolin A, Barnes KC, O'Neil J, Neuberg D, Weng AP, Aster JC, Sigaux F, Soulier J, Look AT, Young RA, Califano A, Ferrando AA, 2006. NOTCH1 directly regulates c-MYC and activates a feed-forward-loop transcriptional network promoting leukemic cell growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(48): 18261–18266.

Ran W, Dean M, Levine RA, Henkle C, Campisi J, 1986. Induction of c-fos and c-myc mRNA by epidermal growth factor or calcium ionophore is cAMP dependent. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(21): 8216–8220.

Shah MV, Namigai EK, Suzuki Y, 2011. The role of canonical Wnt signaling in leg regeneration and metamorphosis in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. *Mechanisms of Development*, 128(7): 342–358.

Tian K, Xu W, 2013. High expression of PP2A-Aα is associated with diapause induction during the photoperiod-sensitive stage of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. *Journal of Insect Physiology*, 59(6): 588–594.

Xu W, Lu Y, Denlinger DL, 2012. Cross-talk between the fat body and brain regulates insect developmental arrest. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(36): 14687–14692.

（责任编辑：赵利辉）